بررسی تراکم پیش رس کروموزومی اسپرم افراد سالم و نابارور با استفاده از لقاح تخمک بدون زونای هامستر

آناهیتا محسنی میبدی M.Sc.*، حسین مزدارانی Ph.D.☆♦

☆ دانشکده تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک بالینی

* پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک ناباروری

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک ناباروری

چکیده

* **هدف:** بررسی رخداد تراکم پیش رس کروموزومی (PCC) اسپرم و مقایسه آن در اسپرم افراد بارور و نابارور

* **مواد و روشها:** اووسیت بدون زونای هامستر پس از مجاورت با اسپرم افراد نرمال - اولیگواسپرم و آستنواسپرم بررسی شد. پس از تحریک تخمک‌گذاری هامسترها توسط (PMSG و HCG) اووسیتها در زمان معین، از اویداکت خارج گردید. لایه‌های سلولهای کومولوس به وسیله آنزیم هیالورونیداز و قشر شفاف دور اووسیتها توسط تریپسین برداشته شد. اسپرمها بر اساس نوع ریخت شناسی، حرکت و تعداد طبقه بندی شدند. پس از شستشو و ظرفیت یابی، مجاور سازی اسپرم و اووسیت انجام گردید. سپس اووسیتها به محیط کشت تازه منتقل و در معرض کلسی‌مید قرار گرفتند. با روش تثبیت «تارکوفسکی» از نمونه‌ها لام تهیه و باگیمسای ۱۰درصد رنگ‌آمیزی شدند. بررسی لامها با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰۰× انجام گردید.

* **یافته‌ها:** فراوانی میزان تراکم پیش رس کروموزومی درافراد اولیگواسپرم و افراد سالم با هم تفاوت معنی داری دارد ($P< 0.001$). مشاهدات بیانگر آن است که درصد بسیار بالایی از بیماران آستنواسپرم حاوی کروماتین باز نشده هستند (۷۰/۰۱ درصد). که از نظر آماری با نمونه‌های افراد سالم و افراد اولیگو اختلاف معنی داری دارند ($P< 0.01$). همچنین سر اسپرم دست نخورده در همه موارد دیده شد که فراوانی آن در نمونه‌های اولیگو و آستنو بیشتر از نمونه‌های سالم بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($P< 0.001$).

اما بر خلاف PCC که در نمونه‌های آستنو بیشتر از اولیگو بوده است ($P< 0.001$) فراوانی سر اسپرم در این نمونه‌ها با یکدیگر تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد.

* **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که پدیده غیر طبیعی باز نشدن کروماتین اسپرم و متراکم نشدن آن به صورت کروموزوم که نهایتاً منجر به عدم لقاح می‌شود ناشی از دلایل و عوامل متعددی باشد. فراوانی بالای PCC ممکن است ناشی از نقص کروماتینی، بسته بندی نامناسب DNA، وجود ناهنجاریهای کروموزومی و یا تاخیر ورود اسپرم به داخل تخمکها باشد. نتایج می‌تواند دلایل و عوامل ناشناخته ناباروری در مردان اولیگواسپرم و آستنواسپرم را توجیه کند. ولی اینکه آیا تحریک بسیار پایین اسپرمهای آستنو هم ناشی از ناهنجاریهای کروماتینی آنها و یا بسته بندی نامناسب آن باشد، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

گل‌واژگان: اووسیت بدون زونای هامستر، اولیگواسپرم، آستنو اسپرم، تراکم پیش رس کروموزومی (PCC)

مقدمه

در سال ۱۹۷۰، برای اولین بار مشاهده شد که بعد از ادغام یک سلول انترفازی با یک سلول متافازی، کروموزومهای سلول انترفازی، زودتر از موعد پیش‌بینی شده متراکم می‌شوند.

این القای تراکم کروموزومی در هسته انترفازی، PCC[1] (تراکم پیش‌رس کروموزومی) نام گرفت (۱). موفقیت لقاح آزمایشگاهی به تراکم صحیح و کامل کروموزومهای اسپرم در تخمک متافاز II بستگی دارد. در IVF، عوامل سیتوپلاسمی تراکم کروموزوم یک تخمک متوقف شده در متافاز II می‌تواند باعث القای PCC هسته اسپرم داخل شده به درون آن گردد (۲، ۳).

پس از اتصال غشای سیتوپلاسمی اسپرم با تخمک، هسته اسپرم وارد اووسیت می‌شود و پس از ورود در طی دو مرحله تکامل می‌یابد: ۱) کروماتین هسته اسپرم نامتراکم می‌شود NCD[2] و ۲) پیش هسته نر تشکیل می‌شود (۴). پس از ورود اسپرم به درون اووسیت در غشای سر اسپرم پارگی ایجاد می‌شود که باعث ایجاد پلهای دی سولفیدی کروماتین و نهایتاً ایجاد NCD می‌شود. ایجاد NCD در اووسیت به زمان، دما و عوامل دیگر وابسته است و سرعت آن در گونه‌های مختلف جانوری متفاوت می‌باشد (۵).

از آن جهت که NCD شامل جابه‌جایی پروتامینها با هیستونهای تخمک می‌باشد لذا فاکتورهای متعددی در کارآیی و روند صحیح آن دخالت دارند (۶). قابلیت انجام NCD اسپرمها در اووسیت اکثر پستانداران در اووسیتهای متافاز II و بالغ حداکثر است و پس از لقاح نیز این قابلیت کاهش می‌یابد.

مکانیسم جدا شدن پروتامینها از DNA اسپرم و مکانیسم جایگزینی هیستونهای اووپلاسم در درون DNA اسپرم کاملاً با هم متفاوتند (۷).

در روش لقاح آزمایشگاهی ICSI، که به عنوان نقطه امیدی برای زوجهای نابارور به حساب می‌آید (۸، ۹) اسپرم تزریق شده به درون اووپلاسم، دارای غشایی دست نخورده است. بنابراین می‌توان چنین تصور داشت که رفتار اسپرم در سیتوپلاسم اووسیت در دو روش IVF و ICSI متفاوت باشد و بسیاری از شواهد هم مؤید این نظریه می‌باشد. لذا در این صورت به نظر می‌رسد که میزان وقوع PCC در این دو گروه باید با هم متفاوت باشد (۱۰، ۱۱، ۱۲). البته در برخی منابع نیز، این میزان در دو روش فوق برابر ذکر شده است (۱۳). به نظر می‌رسد که دست‌کاری غشای سیتوپلاسمی اسپرم قبل از ICSI برای ایجاد لقاح کامل و دسترسی به مواد احیاء کننده پلهای دی سولفیدی و القای نامتراکم شدن هسته اسپرم در اووپلاسم ضروری باشد (۱۰، ۱۴، ۱۵).

ظاهراً از مهمترین علل عدم توسعه و پیشرفت رشد جنینها در IVF و ICSI، پدیده PCC در اووسیتها بعد از لقاح است. این پدیده می‌تواند به علت کاهش فعالیتهای داخلی سیتوپلاسم و کاهش عوامل تسریع کننده بلوغ MPF[3] در اووسیت (۱۶، ۱۷) یا فاکتورهای وابسته به اسپرم و یا هر دو باشد (۲).

زمانی که مشخصه‌های ریخت‌شناسی و هورمونی اووسیت بیانگر آن هستند که اووسیت در زمان برداشت و انجام IVF بالغ بوده است، به جای مشخصه‌های درون سیتوپلاسمی اووسیت، فاکتورهای خود اسپرم بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرند. عدم همزمانی تشکیل کروموزومهای متافازی می‌تواند باعث تولید PCC اسپرم و نهایتاً عدم وقوع یک لقاح موفق در IVF گردد (۱۸). بنابراین ناهنجاریهای کروماتینی اسپرم هم ممکن است باعث القای PCC گردند (۱۹). همچنین اسپرماتوزوا با DNA آسیب دیده (۲۰) و یا بسته بندی ناقص کروماتین در اسپرم (۲۱)، می‌تواند از عوامل ایجاد PCC در اسپرم باشد. چراکه به نظر می‌رسد اسپرمهای دارای ناهنجاریهای کروماتینی، برای تولید پیش هسته نر، مستعدتر و آماده‌تر هستند و لذا پیش هسته نر در اسپرمهای دارای ناهنجاریهای کروماتینی سریعتر تشکیل می‌شود (۲۲).

به نظر می‌رسد که با اختلال در روند جایگیری پروتامینها در خلال اسپرماتوژنز، این نواقص در بسته بندی کروماتین شکل بگیرد (۲۳، ۲۴).

ریخت‌شناسی کروموزومهای متراکم شده پیش رس بر اساس مرحله سلولهای اینترفازی در زمان ادغام، متفاوت است. PCC در G1 بسیار بلند و تک کروماتیدی و در G2 بلند و دو کروماتیدی است. PCC در S قطعه قطعه است. شاید این تفاوتها نیز به روند باز شدن کروموزوم اسپرم در اووسیت و نهایتاً به بسته‌بندی ژنوم اسپرم مربوط باشد (۲۵، ۷).

بیشتر بررسیهای انجام شده بر روند PCC اسپرم انسان در اووسیتهای لقاح نیافته انسان پس از IVF و ICSI بوده است. از آنجایی که در بسیاری از موارد، تشکیل PCC در اسپرم، ناشی از اختلالات مربوط به اووسیت می‌باشد، از این رو نمی‌توان PCC اسپرمها را کلاً به مشکل اسپرمها نسبت داد. از ویژگیهای این بررسی آن است که شرایط اووسیتها برای کلیه آزمایشگاهها یکسان بوده و فقط نمونه‌های اسپرم با یکدیگر تفاوت داشته‌اند. بنابراین نمی‌توان قضاوت نسبتاً دقیقتری در مورد نوع اختلال اسپرم و فراوانی PCC پس از نفوذ به داخل اووسیت داشت.

مواد و روشها

* نگهداری و تحریک تخمک گذاری در هامستر

هامستر طلایی در سنین ۶ تا ۸ هفتگی از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. پس از انتقال به مدت یک هفته در دمای (۲۳-۲۰ درجه سانتیگراد) و چرخه نوری شامل ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و تغذیه استاندارد نگهداری شدند تا به وضعیت آزمایشگاه سازگاری یابند. آنگاه آزمایش برای دریافت اووسیت بر روی آنها انجام گرفت. تحریک تخمک‌گذاری در این حیوانات با تزریق درون صفاتی ۱۵ تا ۲۰ واحد PMSG و سپس HCG صورت گرفت و در روز آزمایش، حیوان کشته شد. بعد از جداسازی

1. Premature Chromosome Condensation
2. Nuclear Decondensation
3. Maturation Promoting Factor

اوویداکتها، کومولوسها از ناحیه آمپولا خارج و با هیالورونیداز ۱درصد شستشو داده شدند. بعد از جداسازی اووسیتها از کومولوسها، تخمکها در قطرات حاوی تریپسین ۰/۱درصد قرار گرفتند و قشر شفاف آنها حل شد.

به طور متوسط از هر حیوان بین ۳۰-۲۰ عدد اووسیت به دست آمد. سپس تخمکها به قطرات محیط کشت Hams-F10 منتقل شدند.

* مراحل تهیه و آماده سازی اسپرم

اسپرمها از افراد مراجعه کننده به مرکز ناباروری رویان تهیه و پس از آنالیز پارامترهای اسپرم، اسپرمها بر اساس نوع ریخت‌شناسی، حرکت و تعداد طبقه بندی شدند. تعداد بیش از ۲۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر و حرکت بیش از ۴۰ درصد و ریخت‌شناسی حاوی ۴۰ درصد نرمال به عنوان پایه اعلام شده توسط WHO مبنای کار قرار گرفت (۲۶).

اسپرمها بعد از تقسیم بندی، شامل ۳ گروه شدند: افراد آستنواسپرم، افراد اولیگواسپرم و افراد نرمال به عنوان گروه شاهد.

پس از تهیه اسپرمها طبق روش swim-up شستشو و سپس به مدت ۵ ساعت ظرفیت‌یابی شدند. بعد از ظرفیت یابی، اسپرمها به قطرات مخصوص مجاورسازی منتقل شدند.

* مجاور سازی - کشت و تایید لقاح

اووسیتهای بدون قشر شفاف، به قطرات حاوی اسپرم اضافه شدند. سپس مدتی بین ۲۰ دقیقه تا ۳ ساعت (بر اساس نوع نمونه) در انکوباتور ۳۷ درجه با جو ۵درصد CO_2 قرار گرفتند.

تایید لقاح با مشاهده امتزاج سرهای اسپرم در داخل اووپلاسم انجام شد. در این هنگام اووسیتها به قطرات محیط کشت بدون اسپرم منتقل شدند. سپس به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت در محیط کشت باقیمانده و به قطرات حاوی کلسی‌مید انتقال یافتند.

* تثبیت و رنگ‌آمیزی

تقریباً ۵ تا ۷ ساعت بعد از انتقال به محیط کشت حاوی کلسی‌مید، اووسیتها طبق روش «تارکوفسکی» بر روی لام تثبیت شدند. قبل از شروع مراحل تثبیت، به منظور تهیه گسترده مناسب، اووسیتها در معرض شوک هیپوتونیک قرار گرفتند (۲۷، ۲۸).

لامها به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه قرار گرفتند و سپس با گیمسای ۱۰درصد رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰۰×) بررسی شدند.

شمای کلی کار انجام شده برای مجاور سازی اسپرم انسان و اووسیت بدون قشر شفاف هامستر در شکل ۱ نشان داده شده است.

تصاویری از وجود سر اسپرم و PCCکروموزومها در اووسیت هامستر در شکل ۲ نشان داده شده است.

روز اول	تزریق PMSG	
روز دوم	تزریق HCG	
روز چهارم	صبح	تهیه اسپرم از بیماران- تیمار با روش Swim-up
	↓	
	کشتن حیوان	
	بهد از ظهر	
	→ برداشت اووسیت	مجاورسازی-اسپرم-تخمک
	تیمار آنزیمی	تایید لقاح
	اووسیت بدون زونا	
	انتقال به محیط کشت جدید	
روز پنجم	متوافق سازی در اولین تقسیم میتوز	
	تثبیت	
	تهیه لام	

شکل ۱: شمای کلی آماده سازی اووسیت هامستر، اسپرم انسان و مجاور سازی انها

یافته‌ها

نتایج به دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS(V۱۱/۲) و آزمونهای آنالیز واریانس و LSD (کمترین تفاوت معنی‌دار) تجزیه و تحلیل آماری شد. در این بررسی تعداد ۲۰۵۰ عدد اووسیت هامستر طلایی مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد برای هر فرد نرمال ۱/۵±۱۵ و برای هر فرد ۲/۹±۲۶ و برای هر فرد آستنواسپرم ۱/۸±۲۷ عدد اووسیت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج در جدول ۱ و شکل ۳ خلاصه شده است. از تعداد ۴۵۷ اووسیت بررسی شده در گروه افراد نرمال (۳۰ نفر)، ۳۸۴ اووسیت نشانه‌های نفوذ اسپرم را دارا بودند (۸۴/۰۷درصد) که از این تعداد، ۷۲ عدد اووسیت PCC را نشان دادند (۱۹/۳۷درصد).

در افراد آستنواسپرم و اولیگواسپرم، به منظور دست‌یابی به میزان مناسبی از لقاح و بررسی تعداد کافی از بیماران (۳۰ نفر برای هر گروه)، تعداد اووسیتهای بیشتری مورد بررسی قرار گرفت. یعنی در کل ۷۸۸ عدد اووسیت برای افراد اولیگو و ۸۰۵ عدد آستنو مطالعه شد.

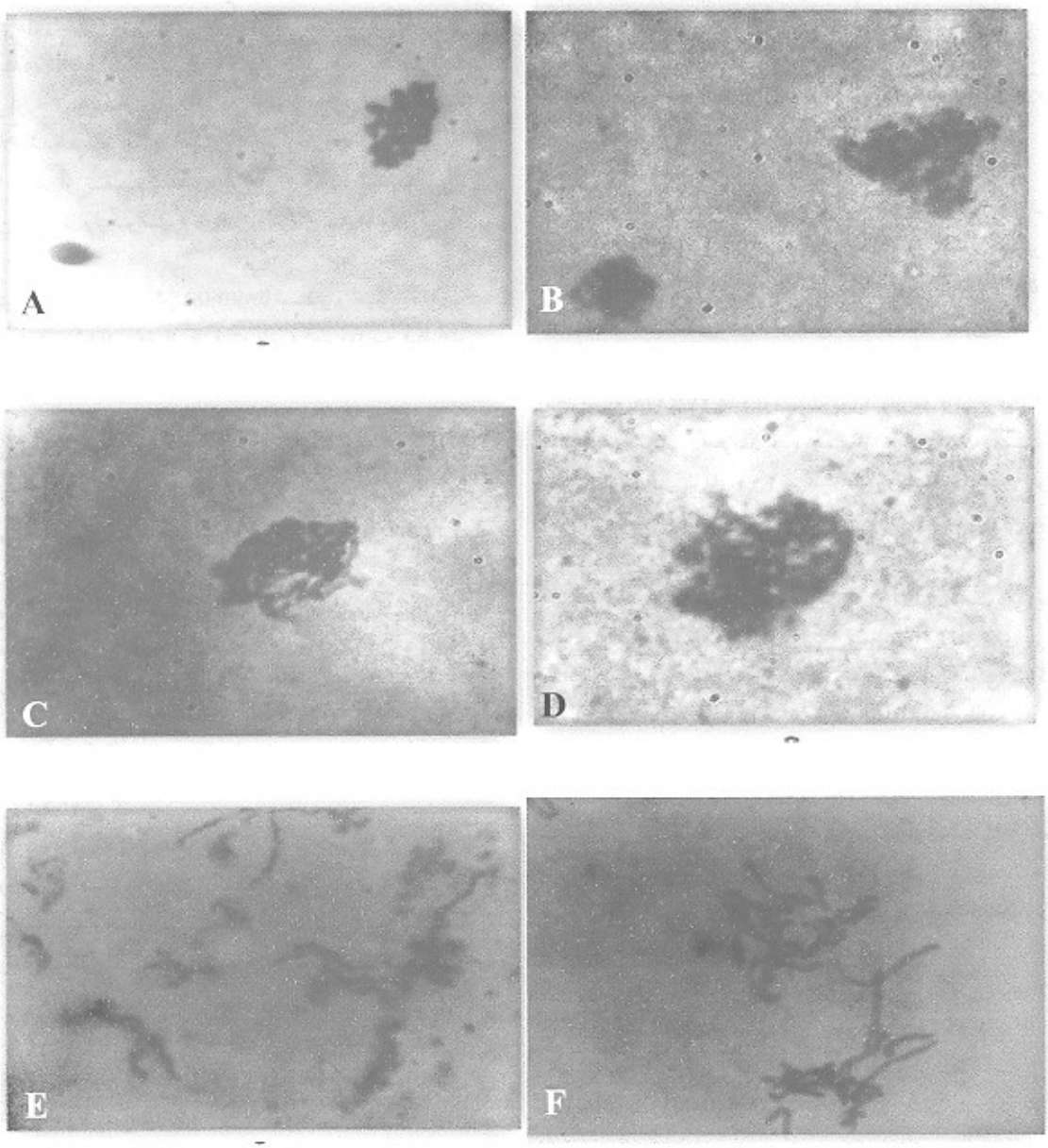
از تعداد ۷۸۸ اووسیت بررسی شده در گروه اولیگواسپرمها، اسپرم در ۵۶۸ اووسیت نفوذ کرده بود (۷۲/۸۶درصد) که از این تعداد ۲۰۴ عدد PCC را نشان دادند (۳۶درصد). از ۸۰۵ اووسیت که در مجاورت اسپرم افراد آستنواسپرم قرار گرفت و ۴۲۳ عدد از آنها نشانه‌های نفوذ اسپرم را دارا بودند (۵۲/۸۷درصد)، تعداد ۲۹۶ عدد، حاوی PCC کروموزوم اسپرم بودند (۷۰/۰۱درصد).

بررسی آماری نشان می‌دهد، بین میزان نفوذ اسپرمهای نرمال و اولیگو با آستنو تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P< 0.001$). فراوانی رخداد PCC در نمونه‌های سالم و اولیگو از نظر آماری با هم متفاوت است ($P< 0.001$). اما این فراوانی با افزایش بیش از ۳ برابر در نمونه‌های آستنواسپرم در مقایسه با نمونه‌های سالم تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($P< 0.001$). تعداد اسپرمهای دست نخورده پس از نفوذ به درون اووپلاسم در نمونه‌های سالم ۸/۹۵درصد، در نمونه‌های اولیگواسپرم ۲۳/۱۴درصد و آستنواسپرم ۲۴/۷۱درصد بوده است که در نمونه‌های اولیگو و آستنو فراوانی مشابه هم می‌باشد

و با نمونه‌ای سالم از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0.001$).

جدول ۱: نتایج اصلی مجاورسازی اسپرمهای افراد سالم و نابارور با اووسیت هامستر طلایی

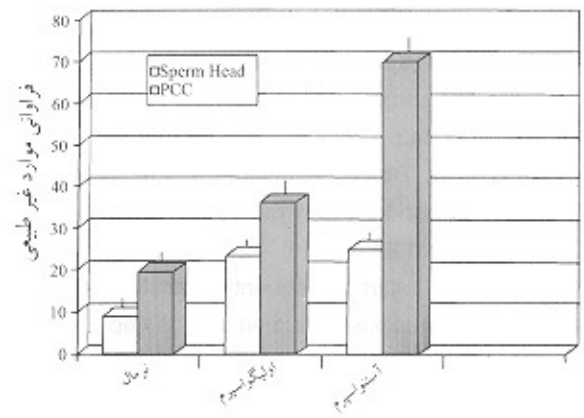
مشخصه اسپرم	تعداد اووسیت بررسی شده	میزان نفوذ اسپرم	سرهای اسپرم دست نخورده	PCC
نرمال	۴۵۷	۳۸۴	۳۴	۷۲
اولیگو اسپرم	۷۸۸	۵۶۸	۱۳۱	۲۰۴
استنو اسپرم	۸۰۵	۴۲۳	۱۰۵	۲۹۶
جمع کل: ۲۰۵۰				



شکل ۲: نمایش وجود سر اسپرم دست نخورده و کروموزمهای اسپرم در اووسیت بدون زونای هامستر

A: سرهای اسپرم دست نخورده، C و B ،D: G1-PCC، سر اسپرم و PCC

B: کروموزوم اووسیت و PCC اسپرم



شکل ۳: فراوانی تراکم پیش رس کروموزومی و سر اسپرم در اووسیت بدون زونای هامستر پس از مجاورت با اسپرم افراد سالم و نابارور

بحث

PCC در روندهای غیر طبیعی بعد از لقاح ایجاد می‌شود که ممکن است به علت مشکلات تکنیکی؛ مشکلات فاکتورهای داخلی اووسیت و یا مشکلات کروماتینی اسپرم باشد. عدم کارکرد متقابل و صحیح فاکتورهای اووسیتی و ژنوم اسپرم، به هرکدام از دلایل فوق منجر به PCC می‌شود که در نهایت همه فاکتورهای فوق تعیین کننده هستند (۲۹).

نتایج بررسی تخمکهای هامستر پس از مجاور سازی در کنار اسپرمهای افراد مختلف نشان دهنده این است که ورود اسپرم به داخل اووپلاسم یک تخمک متوقف شده در متافاز II شرایط کافی برای دستیابی به لقاح موفق را فراهم نمی‌آورد. چنانچه در جدول ۱ نشان داده شده است، علاوه بر آن که سرعت پایین اسپرمهای آستنو درصد ورود آنها را به درون اووسیتها کاهش می‌دهد، درصد بالای PCC در آنها بیانگر آن است که یکی از دلایل عدم لقاح موفق در این دسته از افراد، رخداد میزان بالای PCC آنها است (شکل ۳).

تعیین قدرت بالقوه اسپرمها با ناهنجاریهای کروماتینی برای لقاح، در IVF، به سختی امکان‌پذیر است چرا که نتیجه ممکن است هنگام شروع واکنش آکروزومی و واکنشهای متقابل غشای اسپرم با اووسیت تحت تاثیر قرار بگیرد (۲۱). به نظر می‌رسد که حتی ورود صحیح و کامل اسپرم به اووسیت بالغ در فاز MII، به تنهایی نمی‌تواند شرط لازم و کافی برای وقوع لقاح باشد. اگر اسپرم سریعتر از زمان مناسب به عوامل متراکم کننده کروموزوم واکنش نشان دهد، اما تخمک فعال نشده و درمیتوز II باقی بماند، PCC کروموزومهای اسپرم رخ می‌دهد (۱۰).

به نظر می‌رسد که بیشترین علت عدم وقوع لقاح بعد از ICSI، عدم فعال شدن اووسیت باشد ولی نامتراکم شدن سر اسپرم و فعال‌سازی اووسیتها بعد از ICSI به صورت غیر وابسته به هم نیز می‌تواند رخ دهد (۱۱).

پس می‌توان نتیجه گرفت که چون در مراحل مختلف ICSI، بر خلاف IVF، واکنشهای متقابل غشای اسپرم با اووسیت زیاد مطرح نیست، بیشتر توجه به بسته‌بندی و کیفیت کروماتین اسپرم به منظور تشکیل پیش هسته نر منعطف می‌شود. وجود DNA آسیب دیده در اسپرم نیز ممکن است باعث وقوع این پدیده گردد (۲۰، ۳۰).

Sakkas و همکارانش نشان دادند که ریخت‌شناسی و ناهنجاریهای کروماتینی اسپرم بر روی لقاح صحیح تاثیر می‌گذارند و بسته‌بندی غلط و یا ضعیف کروماتین و یا صدمات DNA ممکن است با مراحل مختلف روند لقاح تداخل یابند (۱۹). و این مشاهدات با نتایج این تحقیق (شکل ۳) که مبین رخداد PCC بیشتر در اسپرم افراد آستنواسپرم است مطابقت دارد.

حتی ناهنجاریهای کروماتینی اسپرم ممکن است آن را نسبت به عوامل خاص خارج ژنی نیز، که منجر به ناهنجاریهای بیشتر می‌شود، مستعدتر سازد. تفاوتهای مشاهده شده در درصد اسپرمهای متراکم شده، ممکن است به علت ناهنجاریهای کروماتینی حاصل از صدمات مکانیکی یا فیزیکی افزایش یابد. این ناهنجاریهای کروماتینی ممکن است مراحل آغازی مکانیسمهای تراکم اسپرم را هم مختل سازد (۳۰). یکی از عواملی که بسته‌بندی صحیح کروماتین را مختل می‌سازد، مشکلات جایگیری پروتامینها در خلال اسپرماتوژنز است. اسپرم افراد نابارور درصد بیشتری از ناهنجاریهای کروماتینی مربوط به جایگیری غیر صحیح پروتامینها را از خود نشان داده‌اند (۲۳).

وجود ارتباط میان این بسته‌بندی غیر صحیح کروماتین و حضور شکستهای کروموزومی در افراد نابارور نیز نشان داده شده است. همه این موارد ممکن است به علت عدم کارکرد صحیح در روند بسته بندی DNA هنگام اسپرماتوژنز مربوط باشد (۳۱).

همچنین ممکن است وجود مقدار کمی از پروتئینهای هیستون در کروماتین اسپرم عامل باز نشدن آن باشد (۳۲):

با توجه به اینکه حدود ۱۰ درصد DNA اسپرم بالغ انسان متصل به هیستون است، ممکن است هیستونهای اسپرم به طور کامل در حین توسعه پیش هسته نر برداشته نشود. در هر صورت، این احتمال وجود دارد که، مقادیر غیر طبیعی هیستون در سر سلولهای نر و ماده همراه با مقادیر متغیر پروتامین، روند طبیعی عملکرد کروماتین در مراحل اولیه بعد از لقاح را تغییر دهد (۳۳).

در برخی موارد، درصد بالاتری از پدیده PCC در یک شخص خاص دیده می‌شود. در این موارد، می‌توان درصد ارتباط وقوع این پدیده را با فاکتورهای ژنومی اسپرم، بیشتر دانست (۳۴).

در نهایت با مشاهده تفاوت عمده‌ای که در میزان وقوع PCC در اسپرم افراد آستنو و اولیگواسپرم با افراد گروه نرمال (جدول ۱، شکل ۳) از یک طرف و دانستن این موضوع که PCC یکی از دلایل عدم وقوع لقاح موفق است، شاید یکی از دلایل ناباروریهای ناشناخته در افراد آستنو اولیگواسپرم رخداد PCC باشد.

References

1. Johnson RT, Rao PN; Mammalian cell fusion; Induction of premature chromosome condensation in

interphase nuclei. Nature 1970; 226: 717-722
2. Schmiday H, Sperling K; Prematurely condensed human sperm chromosomes after (IVF); Hum Genet 1986; 74: 441-443
3. Schmiday H, Tandler Schneider A; Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after ICSI. Hum Rep 1996; 11(10): 2239-45
4. Lassalle B, Testart J; Sequential transformations of human sperm nucleus in human egg. J Rep Fert 1991; 91: 393-402
5. Perreault SD, Ba Bee RR; Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. Biol Rep 1988; 39: 157-167
6. Foresta C, Zorzi M: Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. Int J Androl 1992; 15: 330-337
7. Ohsumi K, Katagiri C: Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from total sperm nuclei; Dev Biol 1991; 148: 295-305
8. Palermo G, Joris H: Pregnancies after (ICSI) of single spermatozoa into an oocyte. Lancet 2002; 340: 17-18
9. Palermo G, Joris H: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and ICSI. Fertil Steril 1993; 59: 826-835
10. Dozortser D, Desutter P: Behavior of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after ICSI. Hum Rep 1994; 9: 2134-2144
11. Flaherty SP, Payne D: Aetiology of failed and abnormal fertilization after ICIS. Hum Reprod 1995; 10: 2623-2629
12. Mozdarani H, Aghdaei F: Cytogenetic analysis of failed fertilized oocytes from Iranian infertile women after IVF and ICSI procedures; Middle East Fertility Society Journal. 2001; 6: 3: 216-225
13. Edirisinghe WR, Murch A: Cytogenetic abnormalities of unfertilizedoocytes generated from IVF and ICSI: a double blind study. Hum Rep 1997; 12: 2784-2791
14. Dozortsev D, Rybouchkin A: Sperm plasma membrane damage prior to ICIS; a necessary condition for sperm nucleus decondensation. Hum Rep 1995; 10: 2960-2964
15. Gerris J, Mangelschots K: ICSI and sever male factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. Hum. Rep 1995; 10: 484-486
16. Masui Y, Markert CL: Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J Exp Zool 1971; 117: 129-146
17. Murragy AW, Kirschner MW: Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature 1989; 339: 275-280
18. Eichenlaub R, Schmiday H: Recurrent failure in polarbody formation and premature condesation in oocytes from a human patient: Indicators of asynchrony in nucleus and cytoplasmic maturation Hum Rep 1995; 10(9) 2343-2349
19. Sakkas D, Urner F: Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after ICSI. Hum Rep 1996; 11-14: 837-843
20. Bianchi PG, Mani Cardi: Effect of DNA protamination on fludrochrome staining and in-situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. Biol-reprod 1993; 49: 1038-1043
21. Bianchi PG, Manicardi: Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. Mol Hum Rep 1996; 2: 139-144
22. Perreault SD, Naish SJ: The timing of Hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. Biol Rep 1987; 36: 239-244
23. Belokopytova LA, Kostyleva E: Human male infertility may be due to a decrease of the protamine (P2). content of sperm chromatin. Mal Rer Deve 1993; 34: 53-57
24. Yebra DE, Balleson L: Complete selective absence of protamine P2 in human. J Biol Chem 1993 268: 10553-10557
25. Schmiday H, Kentenich H: PCC after IVF; Hum. Rep 1989; 4(6): 989-995
26. Simon H, Ektin MJ: What is male infertility? Nidus information service, 1998; http://www.well.connected.com
27. Tarkowski AK: An Air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. Cytogenetics 1996; 5: 394-400
28. Kamiguchi Y, Funaki K: A new technique for chromosome study of murine oocytes; Proc Jap Acad. 1976; 52: 316-321
29. Rosenbuch BE: Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes facility to fertilize after ICIS. J Assis Rep Gen

2000; 17(5): 253-259
30. Sailer BI, Jost LK: Mammalian sperm DNA susceptibility to in-situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. J Androl 1995; 16: 80-87
31. Manicardi GC, Bianchi PG: Underprotamination and nicking of DNA in ejaculated human spermatozoa are highly related phenomena. Biol Rep 1995; 52: 864-867
32. Tesarik J, Kopecny V: Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated within early RNA synthetic activity; Exp Cell Res; 1990; 191: 153-156
33. Tesarik J, Sousa M; Spermatids as gametes: Indications and limitations; Hum Reprod; 1998; 13(3): 89-107
34. Tejada MI, Mendoza R: Factors associated with premature chromosome condensation (PCC) following in vitro fertilization. J Assist Rep Gen 1992; 9: 61-67